6 月 June
2020, 63(6): 688 – 696
昆 虫 学 报
ACTA ENTOMOLOGICA SINICA
http: // www. insect. org. cn
doi: 10.16380/j. kcxb. 2020. 06. 004

低温胁迫下意大利蜜蜂预蛹的差异表达基因趋势分析

姚　丹，周姝婧，周冰峰，徐新建*，朱翔杰*

（福建农林大学动物科学学院（蜂学学院），福州 350002）

摘要：【目的】蜜蜂是典型的具有发育狭温性的全变态昆虫。本研究以对低温最敏感的意大利蜜蜂 *Apis mellifera ligustica* 预蛹为研究对象，通过低温胁迫不同时间的差异表达基因（differentially expressed genes, DEGs）趋势分析，探讨低温胁迫对蜜蜂发育影响的关键基因。【方法】对 3 日龄意大利蜜蜂封盖子预蛹进行 20℃ 低温胁迫 18 h（T18）和 36 h（T36），以未经低温胁迫的预蛹为对照（CK），通过 Illumina HiSeq^{TM} 平台进行转录组学测定。利用 Short Time-series Expression Miner（STEM）软件对 2 个处理组与对照组比较共有的差异表达基因进行趋势分析，再进一步对显著富集趋势模式中富集的差异表达基因进行 GO 分类和 KEGG pathway 分析。利用 RT-qPCR 对随机挑选的 5 个 DEGs 的表达模式进行验证。【结果】对检测到 1 062 个 T18 *vs* CK 和 T36 *vs* CK 共有的 DEGs 进行趋势分析，发现 3 个显著的基因表达模式，包括 2 个上调表达模式（Profile 6，有 539 个基因；Profile 7，有 271 个基因），1 个下调表达模式（Profile 1，有 183 个基因）。对 3 个显著富集趋势模式 DEGs 分别进行 GO 富集分析和 KEGG pathway 分析，在 Profile 6 中找到同时富集在 FoxO 信号通路和寿命调节信号通路上的胰岛素样肽基因 *ILP* 和叉头蛋白 O 基因 *FoxO* 持续上调，说明低温胁迫会影响蜜蜂预蛹蜕皮激素信号传递；在 Profile 7 中 CREB 结合蛋白基因 *CBP* 持续上调，蜜蜂预蛹受到低温胁迫会影响细胞发育；在 Profile 1 中细胞色素 P450 基因 *CYP450 306a*1（*phm*）和 *WNT*1 显著下调，说明化蛹时受到低温胁迫会影响蜕皮激素的合成。通过 RT-qPCR 分析挑选的 5 个基因的表达结果和高通量测序结果一致。【结论】通过对蜜蜂响应低温胁迫的差异表达基因趋势分析发现，蜜蜂胰岛素和蜕皮激素共同调控的 *FoxO* 可能是低温胁迫抑制蜜蜂化蛹的一个关键基因。本研究为探索低温胁迫影响蜜蜂发育变态的分子调控机制奠定了基础。

关键词：意大利蜜蜂；化蛹；低温胁迫；转录组学；蜕皮激素

中图分类号：S89　　**文献标识码：**A　　**文章编号：**0454-6296(2020)06-0688-09

Trend analysis of differentially expressed genes in prepupae of *Apis mellifera ligustica* under low temperature stress

YAO Dan, ZHOU Shu-Jing, ZHOU Bing-Feng, XU Xin-Jian*, ZHU Xiang-Jie* (College of Animal Sciences (College of Bee Science), Fujian Agriculture and Forestry University, Fuzhou 350002, China)

Abstract:【Aims】Honey bees are of the holometabolous insects, whose brood is typically stenothermic. In order to understand the key genes involved in the sensitivity of the Italian honey bee, *Apis mellifera ligustica* to cold stress, we conducted a trend analysis of differentially expressed genes (DEGs) of cold-sensitive prepupae in response to cold stress.【Methods】The 3 d-old post-capped prepupae were exposed to cold temperature (20℃) for 18 (T18) and 36 h (T36), respectively, with those unexposed to cold stress used as the control (CK), and then subjected to transcriptomic sequencing based on Illumina

基金项目：现代农业蜂产业技术体系建设专项资金（CARS-45-KXJ11）；福建省自然科学基金项目（2016J01699）
作者简介：姚丹，女，1993 年 5 月生，重庆人，硕士研究生，研究方向为蜜蜂生态学，E-mail：331223345@qq.com
* 通讯作者 Corresponding authors, E-mail: xuxinjian1982@126.com; xiangjie_zhu@126.com
收稿日期 Received: 2019-10-29；接受日期 Accepted: 2020-02-11

HiSeq™. Short Time-series Expression Miner (STEM) software was applied to compare the shared DEGs among the three datasets. In addition, GO and KEGG pathway enrichment analyses were performed for DEGs with up- and down-regulation profiles. The expression profiles of five randomly selected DEGs were verified by RT-qPCR. 【Results】Trend analysis showed that 1 062 DEGs shared by T18 *vs* CK and T36 *vs* CK were clustered into three significant profiles including two up-regulation profiles (Profile 6 covering 539 DEGs and Profile 7 covering 271 DEGs) and one down-regulation profile (Profile 1 covering 183 DEGs). GO and KEGG pathway enrichment analyses showed that insulin-like peptide gene (*ILP*) and forkhead box protein O gene (*FoxO*) were up-regulated in both FoxO signaling and longevity regulating pathways within Profile 6, suggesting that ecdysone signaling responds to cold stress during honey bee pupation. The CREB-binding protein gene (*CBP*) in Profile 7 was up-regulated, and *CYP450 306a*1 (*phm*) and *WNT*1 in Profile 1 were down-regulated, suggesting that these genes regulate cell development and ecdysone biosynthesis in response to low temperature. Besides, the expression profiles of the five selected genes based on RT-qPCR analysis were consistent with those based on the transcriptome. 【Conclusion】The trend analysis of DEGs reveals that *FoxO* regulated by insulin signaling and ecdysone signaling in honey bees may act as a key gene that represses honey bee pupation in response to cold stress. Our data lay a foundation for exploring the molecular regulation mechanisms underlying metamorphosis in response to cold stress in honey bees.

Key words: *Apis mellifera ligustica*; pupation; low temperature stress; transcriptomics; ecdysone

蜜蜂不仅为人类提供了丰富多样的蜂产品，而且是农业中最重要的授粉昆虫，在维护生态平衡发挥重要作用(Allen-Wardell *et al*., 1998)。近年来，全球气候变化和病虫害危害导致蜜蜂的种群数量大幅下降(Milbrath *et al*., 2015)，蜜蜂蜂群的减少引起了人们对蜜蜂健康的极大关注。

环境温度是影响昆虫分布、形态、生理、行为等的主要生态因素之一(Burnett, 1949; Ponsonby and Copland, 1996)。独居性昆虫可通过休眠或滞育等方式耐受低温等不良环境，生态幅一般较宽(Tauber and Tauber, 1976)。而蜜蜂的卵、虫、蛹(统称为蜂子)是在蜂群维持较稳定的巢温下发育的，因此形成了狭温性特点，发育温区为 29 ~ 38℃，最适发育温度为 35℃(Tautz *et al*., 2003; Groh *et al*., 2004; 朱翔杰等, 2006)。偏离最适温度，羽化后成蜂的外部形态(Medrzycki *et al*., 2010)、翅脉发育(周冰峰等, 2011; Zhu *et al*., 2018)、神经突触数量(Groh *et al*., 2004)、寿命(Wang *et al*., 2016)和行为(Jones *et al*., 2005; Becher *et al*., 2009)等均受到影响。蜜蜂发育对温度的敏感性，使得蜂子成为研究温度对个体发育影响的理想材料，有助于认识温度与生命的关系。

低温对昆虫的影响主要表现在糖代谢、脂类代谢、氨基酸代谢、嘌呤代谢和硫胺素代谢等代谢通路上富集大量差异表达基因(differentially expressed genes, DEGs)(库尔班·吐松等, 2016; Tang *et al*., 2017; Wang *et al*., 2017; Xu *et al*., 2017; Qin *et al*., 2019)。在 0℃ 下 20 日龄中华蜜蜂 *Apis cerana cerana* 成蜂转录组测序检测到与环境进程相关的 Ca^{2+} 信号通路、FoxO 信号通路、Hippo 信号通路等，同时热激蛋白、锌指蛋白和丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶等差异表达(Xu *et al*., 2017)。

相对其他日龄的蜜蜂封盖子，3 日龄封盖子处于幼虫-蛹变态的过渡期，表现出对低温胁迫最敏感。前期研究发现，不同日龄封盖子经 20℃ 低温胁迫后 3 日龄封盖子最早出现大量封盖子死亡，羽化蜜蜂的寿命也最短(Wang *et al*., 2016)。到目前为止，尚无研究对蜜蜂封盖子发育期间低温敏感的机制给出解释。为了深入研究低温对蜜蜂化蛹影响的分子机制，本研究采用转录组学方法对低温处理不同时间的意大利蜜蜂 *Apis mellifera ligustica* 3 日龄封盖子的共有差异表达基因进行趋势分析，从分子水平探讨蜜蜂化蛹时受低温影响的关键基因和关键通路。本研究对丰富昆虫生态学和昆虫发育生物学有重要意义。

1　材料与方法

1.1　供试蜜蜂

样本取自春季增长阶段的意大利蜜蜂 *A. m. ligustica* 蜂群，通过限制蜂王产卵空间，获得卵龄一

致的蜜蜂卵。3 d 后将卵脾放入同一个哺育群哺育。移入哺育群 5 d 后这些幼虫即将封盖,获取 4 h 内同时封盖的封盖子(封盖巢房内的幼虫和蛹),割取样本巢脾,放入恒温恒湿箱(35 ± 0.2℃, RH 75%)[CTHI-250B, 施都凯仪器设备(上海)有限公司]中培育至 3 日龄(对照组,CK)。再将一部分 3 日龄封盖子放入温度 20 ±0.2℃、RH 75%(Wang *et al.*, 2016)的恒温恒湿箱中分别处理 18 h 和 36 h(分别标记为 T18 和 T36),作为低温处理组。所取的封盖子样本立即用液氮冷冻,放入 –80℃保存备用。每个样本用 30 只封盖子(3 个蜂群,10 头/群)混合建库和高通量测序。

1.2 高通量测序及测序数据质量评估

利用 Trizol 法提取 1.1 节样品全虫总 RNA,用带有 Oligo (dT) 的磁珠富集 mRNA 后, 加入 fragmentation buffer 使其片段成为短片段的 mRNA 为模板。用六碱基随机引物(random hexamers)合成 cDNA 第 1 链,并加入缓冲液、dNTPs、RNase H 和 DNA polymerase I 合成 cDNA 第 2 链,经过 QiaQuick PCR 试剂盒纯化并加 EB 缓冲液洗脱经末端修复、加碱基 A,加测序接头,再经琼脂糖凝胶电泳回收目的大小片段,并进行 PCR 扩增,从而完成整个文库制备工作,构建好 cDNA 文库,高通量测序委托广州基迪奥生物科技有限公司完成,测序平台为 Illumina HiSeq™。对下机数据的 raw reads 进行过滤,去除含 adapter 的 reads、含 N 比例大于 10% 的 reads 和低质量的 reads,最终得到 clean reads,然后利用 Tophat2 (2.1.1)软件将 reads 比对到西方蜜蜂 *Apis mellifera* 的参考基因组(ncbi_GCF_000002195.4)上,并利用 Cufflinks 组装转录本。转录组原始数据已上传 NCBI 的 SRA 数据库(获取号: SRR10912937 – SRR10912945)。

1.3 差异表达基因趋势分析

使用 DESeq2 软件(V1.20.0)对有生物学重复的处理组与对照组间(T18 *vs* CK, T36 *vs* CK)基因表达量进行差异分析(Love *et al.*, 2014), DEGs 筛选条件为 FDR(错误发现率)≤0.05, $|\log_2$ Fold change$|$ (Fold change, FC, 指基因表达水平的变化倍数, FC = T/CK,其中 T 为处理组的基因表达水平, CK 为对照组的基因表达水平)≥1。利用 STEM (Short Time-series Expression Miner),选择参数{-pro 20 -ratio 1.0[$\log_2(2) = 1$, $\log_2(1.5) = 0.5849625$, $\log_2(1.2) = 0.2630344$]}(Ernst and Bar-Joseph, 2006),对 2 个比较组间共有的差异表达基因进行趋势分析,在软件中设置 $P \leqslant 0.05$ 为差异显著的表达模式。

1.4 差异表达基因 GO 及 KEGG pathway 富集分析

对各个趋势中的基因进行 GO(Gene Ontology)和 KEGG(Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes)代谢通路进行功能注释(Omicshare tools, http://www.omicshare.com/tools/home/index/index.html),并通过假设检验计算得到 *P* 值。得到的 *P* 值通过 FDR 校正之后,以 *P* 值≤0.05 为阈值,满足此条件的 GO 条目(term)和通路(pathway)定义为在该趋势中显著富集的 GO term 和 Pathway。

1.5 RT-qPCR 基因验证

随机挑选 5 个趋势显著的基因进行 RT-qPCR 验证, *β-actin* 为内参基因(引物见表 1)。利用 RNA 抽提试剂盒提取样本总 RNA,利用反转录试剂盒合成 cDNA 第 1 链(北京全式金生物技术有限公司)。以上述的 cDNA 作为模板进行 qPCR,反应体系(20 μL): H_2O 6.6 μL, 2 × TransStart SuperMix 10 μL, 上下游引物(5 μmol/L)各 1 μL, cDNA 模板 1 μL,

表 1 RT-qPCR 引物信息
Table 1 Primers for RT-qPCR

基因 Gene	GenBank 登录号 GenBank accession number	基因描述 Gene description	引物序列 (5′–3′) Primer sequence
β-actin	413144	Actin 相关蛋白 11 Actin-related protein 11	F: TGCCAACACTGTCCTTTCTG R: AGAATTGACCCACCAATCCA
kibra	413440	Kibra 蛋白 Protein kibra	F: CGCCTATCAGCGAAACACCT R: GGCCTCGAATACTCCCGAAT
FoxO	727091	叉头蛋白 O Forkhead box protein O	F: TACCAGTGCTCCAGATGAACG R: CGGCGCTACTGTTGCTTTCT′
CBP	726332	类组蛋白乙酰转移酶 p300 Histone acetyltransferase p300-like	F: TGTCCTGTATGCCTATCTTT R: CGCTCTTCTCATTTCGGTTT
Myo20	551706	新肌球蛋白 IXb Unconventional myosin-IXb	F: GAGGCACATCTTCCTTAGCG R: CGTCACTCCTATCGTCGTCTT
arm	408399	Armadillo 体节极性蛋白 Armadillo segment polarity protein	F: ACGAGGGTGACCTGAGTTTC R: GCCTCACGGATTCGTTTCTC

Dye II 0.4 μL。qPCR 反应条件：95℃预变性 4 min；95℃变性 15 s，60℃退火和延伸 45 s，共 40 个循环；熔解曲线默认系统程序（QuantStudio5，美国）。样本取自 1.1 节，对照组和处理组的封盖子均来自 3 个蜂群，每个蜂群取 1 头进行混合提取总 RNA。每个样本设置 3 次目的基因的重复扩增。

1.6　数据分析

目的基因的 RT-qPCR 表达水平按照内参基因的 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法进行计算，即 $\Delta Ct = Ct_{目的基因} - Ct_{内参基因}$（Livak and Schmittgen，2001），各基因的相对表达量经 $\log_2(X)$ 转换后与高通量测序中的表达水平进行比较。应用 SPSS V21.0 软件对每个基因处理组与对照组之间平均相对表达量的差异显著性进行非配对 *T* 检验。

2　结果

2.1　测序结果质量

通过对 CK，T18 和 T36 测序，分别得到原始读段平均为 56 759 342，45 977 301 和 54 196 127，过滤后得到高质量有效读段平均分别为 55 578 624，45 032 615 和 53 121 097。统计两端的 Q20 和 Q30 分别平均在 98.20% 和 94.85% 以上。表明本研究测序数据质量良好，可用于进一步分析。

2.2　差异表达基因趋势

通过差异表达基因（DEGs）分析，T18 *vs* CK 有 1 394 个 DEGs，T36 *vs* CK 有 2 722 个 DEGs，说明随着低温处理的时间增长，受影响的基因数明显增加。其中两比较组共有 DEGs 1 062 个，T18 *vs* CK 特有 DEGs 有 332 个，T36 *vs* CK 特有 DEGs 有 1 660 个，上调趋势的 DEGs 显著多于下调趋势的 DEGs。

对两比较组共有的 1 062 个 DEGs 进行趋势分析，在 8 个基因表达模式中有 3 个为显著基因表达模式（$P < 0.05$），包括 2 个上调表达模式，Profile 6 模式为基因表达量先增加后保持不变，有 539 个基因；Profile 7 模式为基因表达量随低温胁迫时间延长一直上调，有 271 个基因；1 个下调表达模式 Profile 1，为随低温胁迫时间延长基因表达量先下调表达，之后保持不变，有 183 个基因（图 1）。多数基因归入上述 3 个显著基因表达模式。

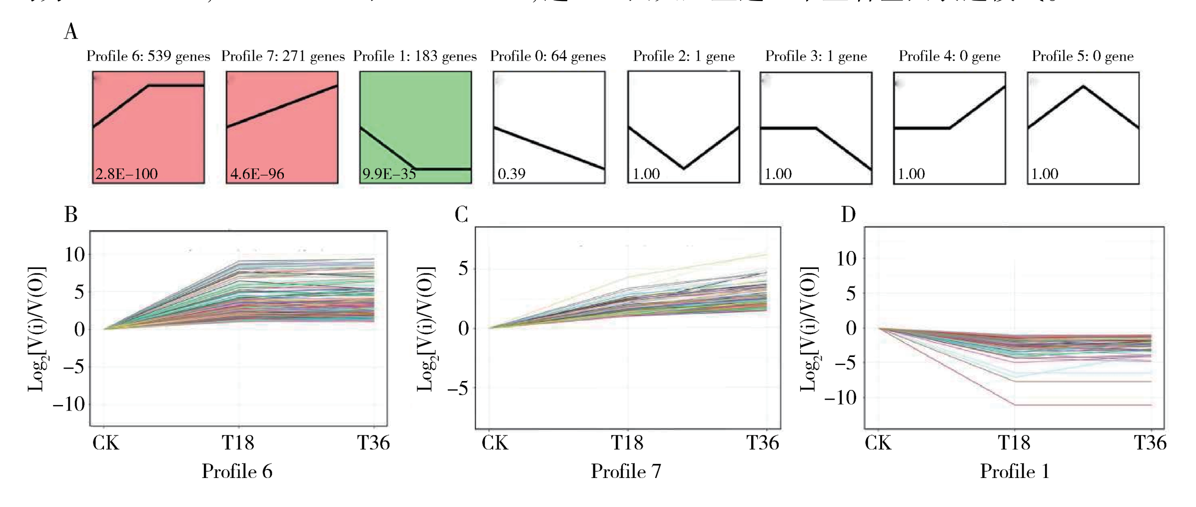


图 1　低温胁迫不同时间 3 日龄意大利蜜蜂封盖子差异表达基因表达趋势

Fig. 1　Trend analysis of differentially expressed genes (DEGs) in the 3 d-old post-capped brood of *Apis mellifera ligustica* subjected to low temperature stress for different time

A：DEGs 的趋势分析结果，趋势类型方框内数字为 *P* 值 The result of trend analysis of DEGs, the number in the box denoting the *P*-value；B：Profile 6 包含 DEGs 的表达模式 Expression profile of DEGs in Profile 6；C：Profile 7 包含 DEGs 的表达模式 Expression profile of DEGs in Profile 7；D：Profile 1 包含 DEGs 的表达模式 Expression profile of DEGs in Profile 1. CK：对照组（未经低温胁迫的 3 日龄封盖子）Control group (3 d-old post-capped brood unexposed to low temperature)；T18：20℃低温处理 18 h 的 3 日龄封盖子 3 d-old post-capped brood exposed to low temperature (20℃) for 18 h；T36：20℃低温处理 36 h 的 3 日龄封盖子 3 d-old post-capped brood exposed to low temperature (20℃) for 36 h. 下图同 The same below.

2.3　差异表达基因的 GO 分类

GO 富集分析结果显示，3 日龄意蜂封盖子在受到低温胁迫后 DEGs 归类到生物学进程的基因数最多。Profile 6 趋势上的 DEGs 分别富集在 30 个 GO 条目上，Profile 7 趋势上的 DEGs 富集在 28 个 GO 条目上。这两种趋势从生物学进程分析，主要富集在细胞进程、代谢进程、单有机体进程；从分子功能分析，主要富集在结合、催化活性、分子传感器活性；从细胞组件分析，主要富集在细胞膜组分、细胞膜、细胞。除此之外 Profile 6 趋势中的 DEGs 还富集在

核酸结合转录因子活性、生物学进程负调控、发育进程、突触和突触组分上，而 Profile 7 趋势中还富集在行为(1 个)、转录因子活性、蛋白质结合(1 个)、细胞连接等条目上(图 2)。

Profile 1 为随低温胁迫时间延长基因表达量先下调表达，之后保持不变，该趋势上富集 183 个 DEGs，这些基因富集在 25 个 GO 条目上，排在前 10 的 GO 条目分别为代谢进程(28 个)、单有机体进程(26 个)、结合(22 个)、细胞进程(21 个)、催化活性(18 个)、细胞膜组分(12 个)、细胞膜(12 个)、细胞(12 个)、细胞组分(12 个)、应激(8 个)条目上(图 2)。说明低温胁迫主要影响 3 日龄封盖子的代谢进程和细胞结构等。同时机体核酸结合转录因子活性、发育相关的基因不会随着低温胁迫时间延长表达量改变，与行为相关的基因表达量随着低温胁迫时间延长而升高。

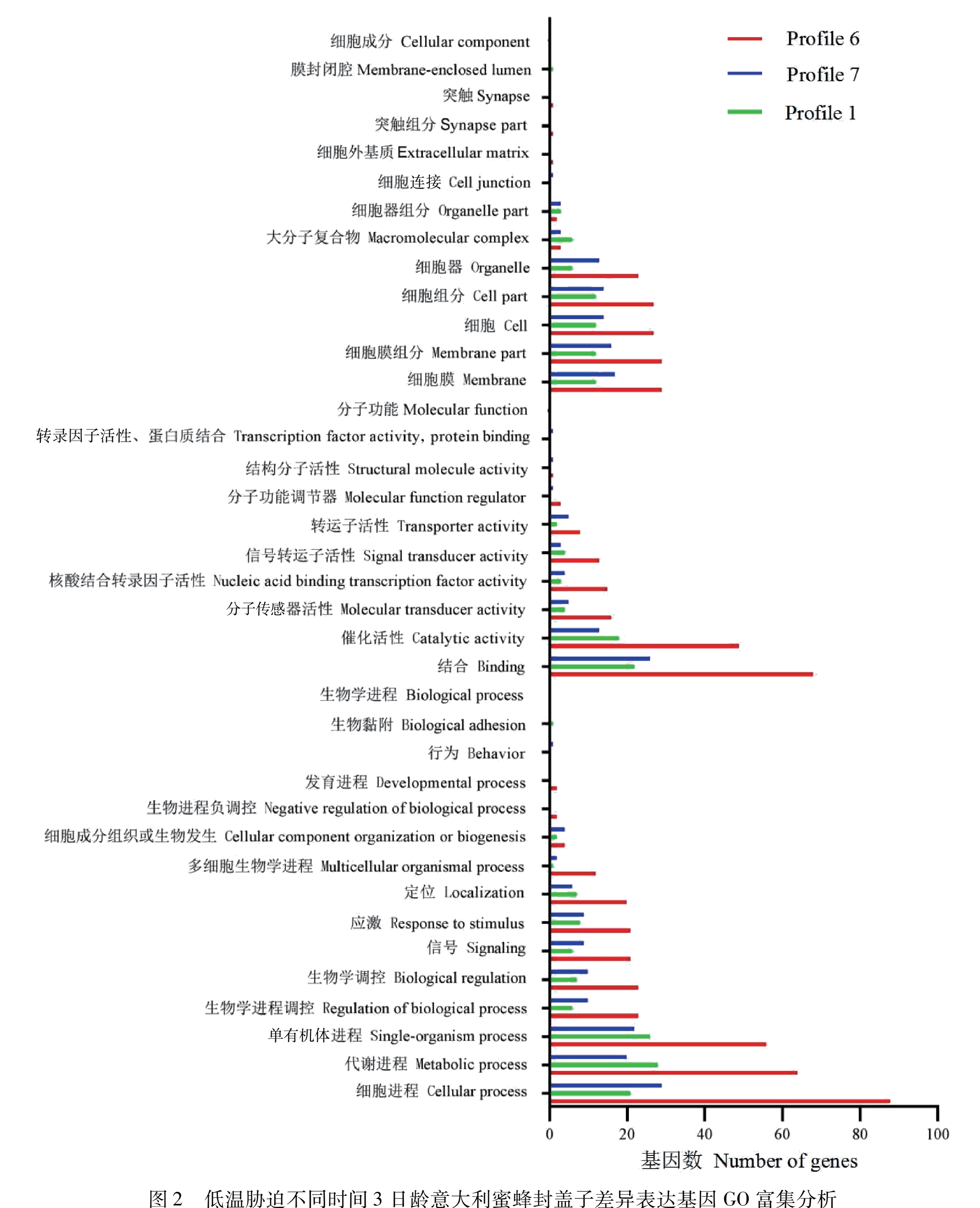


图 2 低温胁迫不同时间 3 日龄意大利蜜蜂封盖子差异表达基因 GO 富集分析

Fig. 2 GO enrichment analysis of differentially expressed genes in the 3 d-old post-capped brood of *Apis mellifera ligustica* subjected to low temperature stress for different time

2.4　差异表达基因的 KEGG pathway 富集分析

通过 KEGG pathway 富集分析结果显示，Profile 6 趋势上的 DEGs 富集在 70 条信号通路上，其中有 48 条与代谢相关的信号通路。基因数富集最多的为代谢途径（22 个）、神经活性受体（11 个）、次生代谢物的生物合成（11 个）、不同环境中的微生物代谢（8 个）、抗生素的生物合成（6 个）、细胞外基质-受体相互作用（5 个）、氨基酸的生物合成（5 个）、拼接体（5 个）、胞吞作用（5 个）等；找到基因 *ILP*（insulin-like peptide receptor gene，ID411297）和基因 *FoxO*（forkhead box protein O gene，ID 727091）同时富集在 FoxO 信号通路和寿命调节信号通路上（表 2）。

Profile 7 趋势中的 271 个 DEGs 富集在 51 条信号通路上，其中与代谢相关的信号通路有 31 条。基因数富集最多的为代谢进程（16 个）、次生代谢物的生物合成（7 个）、嘌呤代谢（4 个）、赖氨酸降解（3 个）、Jak-STAT 信号通路（2 个）、Notch 信号通路（2 个）、淀粉和蔗糖代谢（2 个）、TGF-β 信号通路（2 个）、基础转录因子（2 个）、Hippo 信号通路（2 个）；其中基因 *CBP*（CREB-binding protein gene，ID726332）同时富集在 Jak-STAT，Notch，TGF-β，FoxO 和 Wnt 5 条信号通路上（表 3）。

Profile 1 模式中 183 个 DEGs 富集在 43 条信号通路上。DEGs 主要富集在代谢进程模块中，包括新陈代谢总览中的代谢途径（13 个）、不同环境中微生物代谢（3 个）、次生代谢物的生物合成（3 个）；核苷酸代谢中有嘌呤代谢（3 个）和嘧啶代谢（3 个）；氨基酸代谢中有酪氨酸代谢（2 个）、丙氨酸、天冬氨酸和谷氨酸代谢（2 个）；有 1 个基因 *CYP450 306a1*（*phm*，cytochrome P450 306a1 gene，ID08398）富集在昆虫激素的生物合成信号通路上，还发现基因 *WNT1*（protein Wnt-1 gene，ID 为 413502）同时富集在 Hippo，Wnt 和 hedgehog（Hh）3 条信号通路上（表 4）。

表 2　Profile 6 中 DEGs 基因数富集前 12 的 KEGG 通路

Table 2　Top 12 KEGG pathways enriched by DEGs of Profile 6

通路 Pathway	基因数 Number of genes	通路 ID Pathway ID	*P* 值 *P*-value
代谢途径 Metabolic pathway	22	ko01100	0.9426
神经活性受体 Neuroactive receptor	11	ko04080	0.0000
次生代谢物的生物合成 Biosynthesis of secondary metabolites	11	ko01110	0.3507
不同环境中的微生物代谢 Microbial metabolism in diverse environments	8	ko01120	0.1227
抗生素的生物合成 Biosynthesis of antibiotics	6	ko01130	0.6883
细胞外基质-受体相互作用 Extracellular matrix -receptor interaction	5	ko04512	0.0019
氨基酸的生物合成 Biosynthesis of amino acids	5	ko01230	0.0553
拼接体 Spliceosome	5	ko03040	0.3436
胞吞作用 Endocytosis	5	ko04144	0.3784
Hippo 信号通路 Hippo signaling pathway	4	ko04391	0.1053
FoxO 信号通路 FoxO signaling pathway	3	ko04068	0.2902
寿命调节信号通路 Longevity regulating pathway	2	ko04213	0.4714

表 3　Profile 7 中 DEGs 基因数富集前 12 的 KEGG 通路

Table 3　Top 12 KEGG pathways enriched by DEGs in Profile 7

通路 Pathway	基因数 Number of genes	通路 ID Pathway ID	*P* 值 *P*-value
代谢进程 Metabolic process	16	ko01100	0.3555
次生代谢物的生物合成 Biosynthesis of secondary metabolites	7	ko01110	0.2070
嘌呤代谢 Purine metabolism	4	ko00230	0.1691
赖氨酸降解 Lysine degradation	3	ko00310	0.0357
Jak-STAT 信号通路 Jak-STAT signaling pathway	2	ko04630	0.0466
Notch 信号通路 Notch signaling pathway	2	ko04330	0.0554
淀粉和蔗糖代谢 Starch and sucrose metabolism	2	ko00500	0.0902
TGF-β 信号通路 TGF-beta signaling pathway	2	ko04350	0.1124
基础转录因子 Basal transcription factors	2	ko03022	0.1239
Hippo 信号通路 Hippo signaling pathway	2	ko04391	0.2370
FoxO 信号通路 FoxO signaling pathway	1	ko04068	0.6254
Wnt 信号通路 Wnt signaling pathway	1	ko04310	0.6874

表 4 Profile 1 中 DEGs 基因数富集前 13 的 KEGG 通路

Table 4 Top 13 KEGG pathways enriched by DEGs in Profile 1

通路 Pathway	基因数 Number of genes	通路 ID Pathway ID	*P* 值 *P*-value
代谢途径 Metabolic pathway	13	ko01100	0.0500
嘧啶代谢 Pyrimidine metabolism	3	ko00240	0.0462
嘌呤代谢 Purine metabolism	3	ko00230	0.1337
内质网的蛋白质加工 Protein processing in endoplasmic reticulum	3	ko04141	0.1384
不同环境中微生物代谢 Microbial metabolism in diverse environments	3	ko01120	0.1891
次生代谢物的生物合成 Biosynthesis of secondary metabolites	3	ko01110	0.5612
酪氨酸代谢 Tyrosine metabolism	2	ko00350	0.0127
丙氨酸、天冬氨酸和谷氨酸代谢 Alanine, aspartate and glutamate metabolism	2	ko00250	0.0375
Hippo 信号通路 Hippo signaling pathway	2	ko04391	0.1028
核糖体 Ribosome	2	ko03010	0.3623
昆虫激素的生物合成 Insect hormone biosynthesis	1	ko00981	0.1175
Wnt 信号通路 Wnt signaling pathway	1	ko04310	0.4957
Hh 信号通路 Hedgehog signaling pathway	1	ko04340	0.2217

2.5 差异表达基因的 RT-qPCR 验证

利用 RT-qPCR 技术检测随机挑选的 5 个 DEGs (*kibra*, *FoxO*, *CBP*, *Myo*20 和 *arm*) 的表达模式。结果显示这些 DEGs 的表达水平与 RNA-Seq 测序数据的基因表达水平变化趋势一致(图 3), 说明本次转录组的测序数据真实可靠。

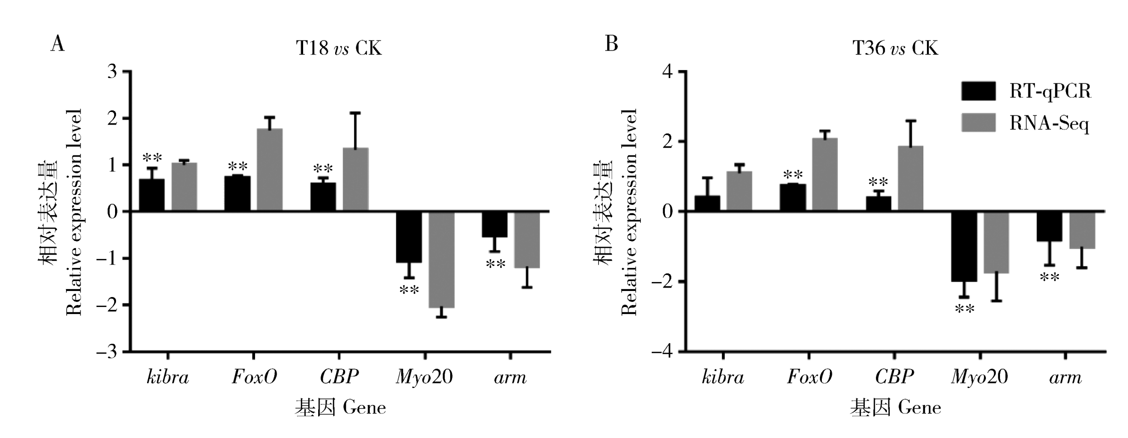


图 3 低温胁迫不同时间 3 日龄意大利蜜蜂封盖子差异表达基因 RNA-Seq 测序数据的 RT-qPCR 验证

Fig. 3 Verification of RNA-Seq sequencing data of differentially expressed genes in the 3 d-old post-capped brood of *Apis mellifera ligustica* subjected to low temperature stress for different time by RT-qPCR

A: T18 *vs* CK; B: T36 *vs* CK. 图中数据为平均值 ± 标准差, 柱上双星号代表同一基因处理组与对照组之间相对表达量差异极显著($P \leqslant 0.01$, 非配对 *T* 检验)。Data in the figure are mean ± *SD*, and the double asterisk above bars represents extremely significant difference between the treatment group and the control group of the same gene in the relative expression level ($P \leqslant 0.01$, unpaired *T*-test).

3 讨论

真社会性昆虫蜜蜂蜂子具有典型的狭温性发育特点, 蜂群维持稳定的合适巢温对蜂子的健康发育具有十分重要意义。3 日龄封盖子是蜜蜂进行化蛹起始阶段(预蛹期), 其低温敏感性强。本研究采用趋势分析对两个梯度时间的低温胁迫预蛹转录本表达模式进行聚类分析, 得到了梯度低温胁迫条件下的 DEGs 及归类, 筛选出具有生物学意义的基因集和蜜蜂响应低温胁迫的关键基因。在此基础上, 我们重点讨论了 FoxO 信号通路中的 *FoxO* 上调表达在低温胁迫后蜜蜂预蛹无法蜕皮化蛹中的可能机制。

低温胁迫可能导致蜕皮激素(20-hydroxyecdysone, 20E)的合成减少。20E 是甾醇类化合物, 是在昆虫前胸腺(prothoracic glands, PG)中以胆固醇或植物固醇类物质为底物, 经一系列酶, 特

别是碳 22-羟化酶、碳 2-羟化酶、碳 25-羟化酶的催化作用合成的（Gilbertet *et al.*, 2003; Gilbertet, 2004）。在对下调模式 Profile 1 中的 DEGs 进行 KEGG 富集分析显示，在激素合成信号通路上存在一个下调基因 *CYP450 306a*1（*phm*），它通过调节碳 25-羟化酶的活性来参与 20E 合成，*phm* 表达量下调将会导致碳 25-羟化酶活性降低，进而影响合成 20E（Niwa *et al.*, 2004; Warren *et al.*, 2004）。因此推测低温会影响 20E 合成，导致其滴度降低。

低温胁迫后，3 日龄封盖子无法化蛹，可能是由于 ILP 调控 FoxO 磷酸化留在细胞质内，无法行使其功能而导致无法蜕皮。昆虫化蛹时 ILP 调控 FoxO 完成蜕皮的过程如下：在昆虫中存在脊椎动物的胰岛素类似物 ILP，它的重要靶标蛋白为 FoxO，在 *ILP* 上调时，FoxO 发生磷酸化，无法进入细胞核而留在细胞质内，促进细胞生长，延迟化蛹（Pan *et al.*, 2018）；当 *ILP* 下调时，FoxO 去磷酸化入核与 20E 和 EcR-Usp 聚合体激活后，诱导 *Br-C*, *E75A* 和 *E75B* 等初级及 *DHR*3, *DHR*4 和 *ftz-f*1 等次级应答基因表达，来激活羧肽酶-A（CPA）表达完成蜕皮发生（Gonzy *et al.*, 2002; Zhou and Riddiford, 2002; Wu and Brown, 2006; Minakuchi *et al.*, 2008; Jinder *et al.*, 2013）。在研究中上调模式 Profile 6 的差异表达基因的富集分析结果显示，在蜕皮相关的 FoxO 信号通路（3 个）、与寿命相关的寿命调节信号通路（2 个）同时富集到了 *ILP* 和 *FoxO* 基因。*ILP* 的表达量上调会导致 FoxO 磷酸化后无法入核留在细胞质内，无法被 20E 和 EcR-Usp 聚合体激活，导致 20E 的初级应答基因 *Br-C* 无法接受 20E 信号，蜕皮信号传递受阻。另外，20E 具有拮抗胰岛素的类似物 ILP 的作用，同时与 ILP 共同调控 FoxO 信号通路，从前一段论述低温胁迫可能导致 20E 滴度降低，也正好与该结果相符。因此推测在 3 日龄封盖子在受到低温胁迫后，FoxO 发生磷酸化留在细胞质内不能入核，是阻碍蜜蜂化蛹的一个关键基因。化蛹是一个极其复杂的过程，蜕皮只是其中的一个环节，除了蜕皮受到影响之外，低温胁迫带来的影响应该还有很多，仍然需要继续关注。

我们前期研究结果显示 3 日龄意蜂封盖子在受到低温胁迫后寿命显著缩短（Wang *et al.*, 2016），*FoxO* 在果蝇的寿命调节起到重要作用（Tatar *et al.*, 2004）。转录组数据显示 *FoxO* 基因在受到低温胁迫时表达量发生改变，这也可能是受到低温胁迫后，蜜蜂寿命缩短的原因之一。

致谢　福建农林大学科研助手刘也齐参与样本获取工作，硕士研究生刘一名、冯睿蓉和李寒参与部分文献研究工作，本科生冯海成、蒋心怡、赫昱畅、常斐然参与部分实验，在此表示感谢！

参考文献（References）

Allen-Wardell G, Bernhardt P, Bitner R, Burquez A, Buchmann S, Cane J, Cox PA, Dalton V, Feinsinger P, Ingram M, Inouye D, Jones CE, Kennedy K, Kevan P, Koopowitz H, Medellin R, Medellin-Morales S, Nabhan GP, Pavlik B, Tepedino V, Torchio P, Walker S, 1998. The potential consequences of pollinator declines on the conservation of biodiversity and stability of food crop yields. *Conserv. Biol.*, 12(1): 8–17.

Becher MA, Scharpenberg H, Moritz RFA, 2009. Pupal developmental temperature and behavioral specialization of honeybee workers (*Apis mellifera* L.). *J. Comp. Physiol. A*, 195(7): 673–679.

Burnett T, 1949. The effect of temperature on an insect host-parasite population. *Ecology*, 30(2): 113–134.

Ernst J, Bar-Joseph Z, 2006. STEM: a tool for the analysis of short time series gene expression data. *BMC Bioinform.*, 7(1): 191.

Gilbert LI, 2004. Halloween genes encode P450 enzymes that mediate steroid hormone biosynthesis in *Drosophila melanogaster*. *Mol. Cell. Endocrinol.*, 215(1–2): 1–10.

Gilbert LI, Rybczynski R, Warren JT, 2003. Control and biochemical nature of the ecdysteroidogenic pathway. *Annu. Rev. Entomol.*, 47: 883–916.

Gonzy G, Pokholkova GV, Peronnet F, Mugat B, Demakova OV, Kotlikova IV, Lepesant JA, Zhimulev IF, 2002. Isolation and characterization of novel mutations of the *Broad-Complex*, a key regulatory gene of ecdysone induction in *Drosophila melanogaster*. *Insect Biochem. Mol. Biol.*, 32(2): 121–132.

Groh C, Jürgen Tautz, Wolfgang Rössler, 2004. Synaptic organization in the adult honey bee brain is influenced by brood-temperature control during pupal development. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 101(12): 4268–4273.

Jinder M, Palli SR, Riddiford LM, 2013. The juvenile hormone signaling pathway in insect development. *Annu. Rev. Entomol.*, 58: 181–204.

Jones JC, Helliwell P, Beekman M, Maleszka R, Oldroyd BP, 2005. The effects of rearing temperature on developmental stability and learning and memory in the honey bee, *Apis mellifera*. *J. Comp. Physiol. A*, 191(12): 1121–1129.

Livak KJ, Schmittgen TD, 2001. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta Ct}$ method. *Methods*, 25(4): 402–408.

Love MI, Huber W, Anders S, 2014. Moderated estimation of fold change and dispersion for RNA-seq data with DESeq2. *Genome Biol.*, 15(12): 550.

Medrzycki P, Sgolastra F, Bortolotti L, Bogo G, Tosi S, Padovani E, Porrini C, Sabatini A, 2010. Influence of brood rearing temperature on honey bee development and susceptibility to poisoning by

pesticides. *J. Apic. Res.*, 49(1): 52-59.

Milbrath MO, van Tran T, Huang WF, Solter LF, Tarpy DR, Lawrence FK, Huang ZY, 2015. Comparative virulence and competition between *Nosema apis* and *Nosema ceranae* in honey bees (*Apis mellifera*). *J. Invert. Pathol.*, 125: 9-15.

Minakuchi C, Zhou X, Riddiford LM, 2008. *Krüppel homolog* 1 (*Kr-h1*) mediates juvenile hormone action during metamorphosis of *Drosophila melanogaster*. *Mech. Dev.*, 125(1-2): 91-105.

Niwa R, Matsuda T, Yoshiyama T, Namiki T, Mita K, Fujimoto Y, Kataoka H, 2004. CYP306A1, a cytochrome P450 enzyme, is essential for ecdysteroid biosynthesis in the prothoracic glands of *Bombyx* and *Drosophila*. *J. Biol. Chem.*, 279(34): 35942-35949.

Pan J, Di YQ, Li YB, Chen CH, Wang JX, Zhao XF, 2018. Insulin and 20-hydroxyecdysone oppose each other in the regulation of phosphoinositide-dependent kinase-1 expression during insect pupation. *J. Biol. Chem.*, 293(48): 18613-18623.

Ponsonby DJ, Copland MJW, 1996. Effect of temperature on development and immature survival in the scale insect predator, *Chilocorus nigritus* (F.) (Coleoptera: Coccinellidae). *Biocontrol Sci. Technol.*, 6(1): 101-110.

Qin M, Wang H, Liu Z, Wang Y, Zhang W, Xu B, 2019. Changes in cold tolerance during the overwintering period in *Apis mellifera ligustica*. *J. Apic. Res.*, 58(5): 1-8.

Tang B, Liu XJ, Shi ZK, Shen QD, Xu YX, Wang S, Zhang F, Wang SG, 2017. Transcriptome analysis and identification of induced genes in the response of *Harmonia axyridis* to cold hardiness. *Comp. Biochem. Physiol. Part D Genomics Proteomics*, 22: 78-89.

Tatar M, Hwangbo DS, Gersham B, Tu MP, Palmer M, 2004. *Drosophila* dFOXO controls lifespan and regulates insulin signaling in brain and fat body. *Nature*, 429(6991): 562-566.

Tauber MJ, Tauber CA, 1976. Insect seasonality: diapause maintenance, termination, and postdiapause development. *Annu. Rev. Entomol.*, 21: 81-107.

Tautz J, Maier S, Groh C, Róssler W, Brockmann A, 2003. Behavioral performance in adult honey bees is influenced by the temperature experienced during their pupal. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 100(12): 7343-7347.

Tusong K, Lu XY, Liu XN, Ma J, 2016. Transcriptome analysis of short-term low temperature stress response of *Carapax trionycis* from Junggar. *Acta Entomol. Sin.*, 59(6): 581-591. [库尔班·吐松, 陆雪莹, 刘小宁, 马纪, 2016. 准噶尔小胸鳖甲短时低温胁迫响应的转录组分析. 昆虫学报, 59(6): 581-591]

Wang J, Gao G, Zhang R, 2017. Metabolism and cold tolerance of Chinese white pine beetle, *Dendroctonus armandi*, (Coleoptera: Curculionidae: Scolytinae) during the overwintering period. *Agric. For. Entomol.*, 19(1): 10-22.

Wang Q, Xu X, Zhu X, Zhou S, Huang Z, Zhou B, 2016. Low-temperature stress during capped brood stage increases pupal mortality, misorientation and adult mortality in honey bees. *PLoS ONE*, 11(5): e0154547.

Warren JT, Petryk A, Marqués G, Parvy JP, Shinoda T, Itoyama K, Kobayashi J, Jarcho M, Li Y, O'Connor MB, Dauphin-Villemant C, Gilbert L, 2004. Phantom encodes the 25-hydroxylase of *Drosophila melanogaster* and *Bombyx mori*: a P450 enzyme critical in ecdysone biosynthesis. *Insect Biochem. Mol. Biol.*, 34(9): 991-1010.

Wu Q, Brown MR, 2006. Signaling and function of insulin-like peptides in insects. *Annu. Rev. Entomol.*, 51: 1-24.

Xu K, Niu Q, Zhao H, Du Y, Jiang Y, 2017. Transcriptomic analysis to uncover genes affecting cold resistance in the Chinese honey bee (*Apis cerana cerana*). *PLoS ONE*, 12(6): e0179922.

Zhou BF, Zhu XJ, Li Y, 2011. New variation of hind wing veins of *Apis cerana cerana* caused by low temperature. *Acta Ecol. Sin.*, 31(5): 1387-1392. [周冰峰, 朱翔杰, 李月, 2011. 低温导致中华蜜蜂后翅翅脉的新变异. 生态学报, 31(5): 1387-1392]

Zhou X, Riddiford LM, 2002. Broad specifies pupal development and mediates the 'status quo' action of juvenile hormone on the pupal-adult transformation in *Drosophila* and *Manduca*. *Development*, 129(9): 2259-2269.

Zhu X, Xu X, Zhou S, Wang Q, Chen L, Hao Z, Zhou B, 2018. Low temperature exposure (20℃) during the sealed brood stage induces abnormal venation of honey bee wings. *J. Apic. Res.*, 57(3): 458-465.

Zhu XJ, Zhou BF, Luo QH, Luo F, Zhong GX, Shi ML, 2006. Effects of temperature on development of bee worker bees in sealing period. *New Agric. Technol.*, (Special Issue): 57-60. [朱翔杰, 周冰峰, 罗其花, 罗芳, 钟贵喜, 史明亮, 2006. 温度对蜜蜂工蜂封盖期发育的影响. 农业新技术, (特刊): 57-60]

(责任编辑: 马丽萍)